

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORSTAND: PROF. DR. N. ZÖLLNER

FETTSÄUREN DER CHOLESTERINESTER UND DES LECITHINS
DER LIPOPROTEINFRAKTIONEN WÄHREND VERSCHIEDENER
LINOLSÄUREZUFUHR

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

VORGELEGT VON
ELISABETH ERTL
AUS
MÜNCHEN

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. G. Wolfram

Mitberichterstatter : Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 28.1.1986

Meinem lieben Mann

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. <u>EINLEITUNG</u>	1
B. <u>VERSUCHSBESCHREIBUNG</u>	6
I. Ablauf des Ernährungsversuches	6
1. Versuchspersonen	6
2. Zuteilung zu den Formeldiäten	6
3. Formeldiäten	8
4. Blutabnahme	
II. Methoden	10
1. Durchgeführte Bestimmungen	10
2. Lipoidextraktion nach Folch-Sperry	11
3. Dünnschichtchromatographie	12
4. Umestern in Methylester	14
5. Ausäthern und Neutralisieren	15
6. Säulenchromatographie	16
7. Gaschromatographie	18
C. <u>ERGEBNISSE</u>	19
I. Versuchspersonen	19
II. Fettsäuren der Cholesterinester	19
1. HDL (high density lipoproteins)	20
2. LDL (low density lipoproteins)	22

	Seite
III. Fettsäuren des Lecithins	24
1. HDL (high density lipoproteins)	24
2. LDL (low density lipoproteins)	27
D. <u>DISKUSSION</u>	31
E. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	37
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	39
<u>ANHANG: TABELLEN UND ABBILDUNGEN</u>	44
<u>LEBENS LAUF</u>	

ABKÜRZUNGEN

=====

DC	Dünnschichtchromatographie
DEGS	Diaethylenglykolsuccinat
EDTA	Aethylendiamintetraacetat
FD	Formeldiät
HDL	high density lipoproteins (Dichte: 1,063 - 1,21)
LDL	low density lipoproteins (Dichte: 1,019 - 1,063)
VLDL	very light density lipoproteins (Dichte: < 1,006)
LCAT	Lecithin: Cholesterol-Acyltransferase

A. EINLEITUNG

=====

Die Häufigkeit der degenerativen Gefäßerkrankungen ist besonders in den hochindustrialisierten Ländern seit dem Ende des 19. Jahrhunderts unaufhörlich im Steigen begriffen. Atherosklerotisch bedingte Herz- und Gefäßkrankheiten sind die führenden Todesursachen und die häufigsten Ursachen für Frühinvalidität in der Bundesrepublik und in anderen Industriestaaten (29).

Als Risikofaktor muß neben mangelnder Bewegung, psychischem Streß, Nikotinabusus, oralen Kontrazeptiva, Diabetes mellitus, chronischen Nierenerkrankungen und vielem anderen vor allem die Überernährung angesehen werden (36); denn 85 % der Erwachsenen in der Bundesrepublik leiden heute an Übergewicht (4).

Mit Zunahme des Wohlstandes haben sich Energiebedarf und -verbrauch in den letzten 100 Jahren gegenseitig entwickelt (31, 35). Wie Wirths (31) nachwies, hat sich seit 1882 der Energiebedarf der deutschen Bevölkerung um ca. 600 kcal pro Kopf und Tag vermindert, während im gleichen Zeitraum die Energiezufuhr um ca. 300 kcal pro Kopf und Tag gestiegen ist (Abb. 1). Dies ist zu einem erheblichen Teil auf den gestiegenen Fleischkonsum, der um fast 500 kcal pro Kopf und Tag zugenommen



hat (24) und auf die damit verbundene erhöhte Zufuhr tierischer Fette zurückzuführen.

Keys (15), Heyden (13) und Goto (12) wiesen auf einen Zusammenhang zwischen koronarer Herzerkrankung und Ernährung hin (Tabelle 1).

Eine Änderung der Ernährung kann Risikofaktoren, welche zur Häufigkeit der Arteriosklerose korreliert sind, vermindern. Hierzu sind zwei wirksame Maßnahmen bekannt.

Zum einen muß die Quantität der Nahrung reduziert und so dem Energiebedarf bzw. -verbrauch angepaßt werden. Das Nahrungsfett soll nicht mehr als 30 % der zugeführten Energie liefern.

Zum andern muß die Qualität des Nahrungsfettes modifiziert werden. Denn die Zusammensetzung des Nahrungsfettes ist von Bedeutung für den Blutfettspiegel und damit das Atheroskleroserisiko (14, 18, 36). Der Anteil der gesättigten Fettsäuren in der Nahrung muß vermindert und der Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren erhöht werden.

Natürlich vorkommende mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie die Linolsäure bestehen aus einer geradzahligen Kohlenstoffkette, cis-Konfiguration und Doppelbindungen im Divinylmethan-Rhythmus, von denen die erste am sech-

sten C-Atom vom CH_3 -Ende her lokalisiert ist (5, 16). Wie Burr (16), Wiese (33), Collins (7), Wolfram (38) und viele andere in Versuchen nachweisen konnten, nimmt die Linolsäure als essentielle Fettsäure für den Menschen eine überaus wichtige Rolle ein:

Sie ist grundlegender Baustein der biologischen Membranen und nimmt Einfluß auf die Funktion membranständiger Enzyme, den Zellstoffwechsel, die Transportsysteme und die zelluläre Immunreaktion (38, 37). Aus ihren Stoffwechselprodukten Dihomo-gamma-Linolensäure und Arachidonsäure baut der Organismus Prostaglandine auf (21) (Abb. 2).

Über die Thromboxan- und Prostacyclinsynthese kann durch Linolsäurezufuhr die Thrombozytenadhäsion und -aggregation beeinflußt werden und damit der Entstehungsprozeß atherosklerotischer Gefäßveränderungen.

Ab einer Zufuhr von 10 Energieprozent (38) pro Kopf und Tag senkt sie die Plasmakonzentration von Cholesterin, Phosphatiden und Triglyceriden (1). Hier wird vor allem das atherogene LDL-Cholesterin gesenkt (17).

Eine Möglichkeit, die Menge der Linolsäurezufuhr über einen längeren Zeitraum abzuschätzen, bietet das Fettsäurespektrum der Cholesterinester.

Sie entstehen in den Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) durch das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase, welches eine Fettsäure aus der Beta-Position des Lecithins auf freies Cholesterin überträgt (23, 11).

Die Synthese der Cholesterinester ermöglicht die Ausscheidung des Cholesterins mit den Gallensäuren und stellt somit einen Endpunkt des Fettstoffwechsels dar.

Von besonderem Interesse sind die linolsäureabhängigen Veränderungen der Phospholipide, da aus ihnen biologische Membranen gebildet werden, aus denen mehrfach ungesättigte Fettsäuren zur Biosynthese von Prostaglandinen und Prostacyclinen freigesetzt werden. Phospholipide sind physikochemisch keine einheitliche Gruppe. Für Untersuchungen des Fettsäurespektrums der Phospholipide ist das Lecithin geeignet, da es der wichtigste Baustein von Zellenmembranen ist und aus ihnen das Enzym Phospholipase A₂ die Arachidonsäure zur Prostaglandinbiosynthese freisetzt. Mit einem Anteil bis zu 80 % der Gesamtphosphatide (2) stellt Lecithin die größte Fraktion der Phosphatide dar. Lecithin wird im Blut wie die Cholesterinester sowohl in den HDL als auch in den LDL transportiert. Die LDL entstehen als Stoffwechselprodukt unter Beteiligung von Lipoproteinlipasen aus den VLDL. Sie sind

für den Transport der Lipide im Blut in die Peripherie verantwortlich (4, 22).

Als eine Art Vorläuferprodukt werden die HDL in Darm und Leber als "Bilayer" (30, 17) bzw. diskoidale HDL (4) geformt und im Plasma mit Hilfe der LCAT (26) zu sphärischen HDL ausgebildet. Ihre Aufgabe besteht in erster Linie darin, Fette v.a. Cholesterinester aus peripheren Zellen zur Leber zurückzutransportieren (22, 17).

Aus den Fettsäurespektren der LDL und HDL lassen sich somit Rückschlüsse auf die Fettsäurezusammensetzung der peripheren Zellen und auf die nahrungsabhängige Fettsäurezufuhr ziehen.

Im folgenden Versuch wurden die Fettsäuren in den Cholesterinestern und im Lecithin der HDL- und LDL-Fractionen während verschieden hoher Linolsäurezufuhr untersucht.

B. VERSUCH

I. Ablauf des Ernährungsversuches

1. Versuchspersonen

An diesem Ernährungsversuch nahmen sechs gesunde Studentinnen im Alter zwischen 26 und 29 Jahren teil. Die Versuchspersonen waren entsprechend den durchgeführten klinischen und laborchemischen Untersuchungen gesund. Fettstoffwechselstörungen der Probanden wurden vor Beginn des Versuchs durch dreimalige Bestimmung der Cholesterin- und Triglyceridfraktion im Plasma ausgeschlossen.

Daten der Versuchspersonen sind in Tabelle 2 im Anhang festgehalten.

2. Zuteilung zu den Formeldiäten

Die Versuchspersonen ernährten sich sechs Wochen lang ausschließlich von Formeldiäten. Es wurden drei Formeldiäten gegeben, welche sich nur in der Zusammensetzung des Fettanteils unterschieden. Jede Versuchsperson erhielt jede Fettart zwei Wochen lang; danach erfolgte ein Wechsel der Formeldiät für jeweils zwei Versuchs-

personen in unterschiedlicher Folge.

Die einzelnen Formelperioden wurden auf zwei Wochen festgesetzt, um sicher zu gehen, daß sich bei konstanter Linolsäurezufuhr konstante Fettsäurespiegel eingestellt haben. Dies wird im allgemeinen nach zehn Tagen erreicht.

Die Fettarten wurden mit den Ziffern I, II und III bezeichnet. Die Versuchspersonen A und B begannen mit Formeldiät III, C und D mit I und E und F mit II, wie aus Tabelle 3 im Anhang ersichtlich.

Vor Versuchsbeginn wurden die Teilnehmer entsprechend einem über acht Tage geschriebenen Ernährungsprotokoll isokalorisch ernährt. Dadurch sollten Änderungen des Gewichts während des Versuchsablaufs nach Möglichkeit ausgeschlossen werden.

Die Teilnehmer A, B, C und F errechneten für sich einen täglichen Endergiebedarf von 2200 kcal (9209,20 J), Versuchsperson D 3000 kcal (12558,0 J) und E 2500 kcal (10465 J). Wurde die Tagesmenge nicht ganz verzehrt, so wurden die Reste zurückgebracht und gewogen, so daß die tägliche Energiezufuhr jedes Teilnehmers ermittelt werden konnte.

Als Getränke standen zur Auswahl Tee, Kaffee (beides ungesüßt und ohne Milch) und Mineralwasser. Die aufgenommene Flüssigkeitsmenge wurde täglich gemessen und notiert.

3. Formeldiäten

Die verabreichten Formeldiäten wurden in der Klinik zubereitet. Die Nährstoffe mischte man mit Wasser in einem Mixer zu einem dickflüssigen Brei.

Formeldiät I war fettfrei. Der Energiebedarf war zu 15 % durch Eiweiß und zu 85 % durch Kohlenhydrate gedeckt. Sie enthielt somit keine Linolsäure.

Formeldiät II hatte ebenfalls einen Eiweißanteil von 15 Energieprozent. Der Kohlenhydratanteil machte 55 % der Nahrungsenergie aus. 30 Energieprozent lieferte ein Fettgemisch aus Distelöl, Olivenöl und Butter, welches pro 2200 kcal 10 g Linolsäure enthielt.

Das Verhältnis der gesättigten zu den ungesättigten Fettsäuren (P/S-Quotient, polyunsaturated/saturated acids) betrug für den Fettanteil der Formeldiät II 0,46.

Formeldiät III bestand wie Formeldiät II aus 15 Energieprozent Eiweiß und 55 Energieprozent Kohlenhydraten. 30 % der Nahrungsenergie wurden durch Distelöl gedeckt, welches bei 2200 kcal Energiezufuhr 50 g Linolsäure enthielt. Aufgrund des erheblich höheren Linolsäuregehaltes war der P/S-Quotient in diesem Fett 11,14.

Die Zusammensetzung der Formeldiäten ist aus Tabelle 4, die der Fettanteile aus Tabelle 5 und 6 ersichtlich.

Als Nahrungseiweiß diente Hyperprotidine, das zu 92 % aus Eiweiß besteht. Für den Kohlenhydratanteil wurde Maltodextrin verwendet. Es enthält Oligosaccharide, die bei diesem Produkt 94,5 % des Gesamtgewichts betragen.

Eine genaue Aufschlüsselung der Formeldiäten ist aus den Tabellen 7, 8 und 9 zu entnehmen.

Pro 2200 kcal Formeldiät wurden 5 g NaCl, 3 g KCl, 0,6 g Cholesterin und 500 ml Wasser zugesetzt.

Jede Versuchsperson erhielt täglich ein Multivitamin-Dragee Protovita (Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen) und jeden zweiten Tag ein Dragee Ferro 66 (Fa. Promonta, Hamburg) mit einem Gehalt von 100 mg Fe II-Chlorid.

4. Blutabnahme

Während der Versuche wurde dreimal, jeweils am Ende einer zweiwöchigen Versuchsperiode Nüchternblut aus der Armvene in EDTA-Röhrchen entnommen. Zusätzlich wurden vierzehn Tage vor Beginn des Ernährungsversuches Ausgangs- und Kontrollwerte aus Nüchternblut unter freier Kost bestimmt.

II. Methoden

1. Durchgeführte Bestimmungen

Um das Fettsäurespektrum der Lecithinfraktion und der Cholesterinester zu bestimmen, fertigte man aus dem Plasma einen Lipoidextrakt nach Folch - Sperry (28) an. Die Abtrennung des Lecithins und der Cholesterinester erfolgte dünnschichtchromatographisch nach Zöllner und Eberhagen (39). Mit Hilfe eines Standards wurden die Fraktionen auf der DC-Platte lokalisiert, abgekratzt und das Lipid eluiert. Durch Umestern stellten sich die Methylderivate der Fettsäuren dar. Um anschließend die gesuchten Methylderivate aufzufangen, wusch man die Proben aus und ließ sie zur nochmaligen Reinigung die säulenchromatische Trennung durchlaufen. Die gaschromatische Bestimmung der Fettsäuremethylester erfolgte im Lecithin und den Cholesterinestern der LDL- und der HDL-Fraktionen.

Für den Versuch wurden folgende Reagentien verwendet:

- Methanol p.a.
- Chloroform p.a.
- Calciumchloridlösung 0,02 % in Aqua dest.
- Kieselgel 0,05 - 0,2 mm
- Petroläther (kp 40 - 60)

- Diäthyläther p.a.
- Essigsäuremethylester p.a. Nr. 9711

Alle Reagentien wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2. Lipoidextraktion nach Folch - Sperry

In einem 25 ml Meßkolben wurde zu 8,3 ml Methanol unter leichtem Schütteln tropfenweise 1 ml Plasma gegeben, um eine feine Ausfällung der Proteine aus dem Plasma zu erreichen. Daraufhin gab man 9 ml Chloroform hinzu und erhitzte das Gemisch im Wasserbad gerade bis zum Kochen. Nach dem Abkühlen wurde der Meßkolben bis zur 25 ml-Marke mit Chloroform aufgefüllt und zur besseren Durchmischung leicht geschwenkt.

Dieses Gemisch ließ man nun durch ein weiches Faltenfilter (Fa. Schleicher-Schüll Nr. 2329 oder 604) laufen, pipettierte davon 20 ml in einen Schüttelzylinder, fügte 8 ml CaCl_2 -Lösung hinzu und schüttelte kräftig. Zur Phasentrennung wurde der Extrakt über Nacht stehen gelassen. Es bildeten sich eine untere hydrophobe Chloroform/Methanol-Phase mit den darin gelösten Plasmalipiden und eine obere wässrige Phase mit hydrophilen Plasmabestandteilen. Die obere Phase wurde mit einer Pipette abgesaugt und verworfen.

3. Dünnschichtchromatographie

Um das Auftragen des Lipoidgemisches auf die DC-Platte zu erleichtern, wurden 10 bis 15 ml des Sperry-Extraktes im Rotationsverdampfer auf ca. 200 μ l eingengt. Auf eine 10 mal 20 cm große mit Kieselgel G beschichtete Dünnschichtchromatographieplatte (Fa. Merck Darmstadt) trug man in einem Abstand von 2 cm vom unteren Rand der Platte den Lipoidextrakt vollständig tropfenweise in einer Linie auf. Um die Auftragsstelle möglichst klein zu halten, wurde nach jedem Tropfen des Lipoidgemisches das Lösungsmittel mit Stickstoff entfernt. Zusätzlich sollte ein Kontakt mit Luftsauerstoff vermieden werden.

Um Verluste der zu untersuchenden Substanz zu vermeiden, wurden die Reagenzgläser mit zweimal 100 ml Chloroform nachgewaschen und die Spülflüssigkeit ebenfalls aufgetragen.

In Höhe des aufpipettierten Lipoidgemisches brachte man auf die DC-Platte beiderseits am Rand jeweils 100 μ l eines Lecithin- und Cholesterinester-Standards punktförmig auf. Hierdurch wurde nach der dünnschichtchromatographischen Trennung das Auffinden der gesuchten Lipoidfraktionen ermöglicht. Die Einteilung der DC-Platte ist aus Abb. 3 zu ersehen.

Für die dünnschichtchromatographische Trennung in der

Kammer wurden als Fließmittel für Cholesterinester ein Gemisch aus Petroläther : Äthylmethyleketon : Essigsäure 95 : 4 : 1 (v : v : v) und für Lecithin ein Gemisch aus Chloroform : Methanol : Aqua bidest.

65 : 25 : 4 (v : v : v) verwendet. Da die Cholesterinester auf der DC-Platte weiter nach oben laufen als das Lecithin, mußte die DC-Platte zuerst in die Kammer mit dem Fließmittel für Cholesterinester (Kammer I) und nach dem Abkratzen der Cholesterinester in die Kammer mit dem Fließmittel für Phosphatide (Kammer II) gestellt werden.

Um eine Sättigung der Luft in der Kammer mit dem Fließmittel zu erreichen, wurde die DC-Kammer mit saugfähigem Papier ausgelegt und nach Einfüllen des jeweiligen Fließmittels luftdicht verschlossen. Sobald das Papier sich vollgesaugt hatte, stellte man die Platte in die Kammer hinein und entwickelte die Platte bis zu einer Laufstrecke von 15 cm. Anschließend wurde das Laufmittel von der Platte im Abzug entfernt und die Auftragsbreite des Lipoidextraktes mit Alufolie abgedeckt.

Die Laufstrecke des Kontrollserums besprühte man nach der Entwicklung in der Kammer I auf der einen, nach der in Kammer II auf der anderen Seite mit Kaliumpermanganat, um den Standard sichtbar zu machen. In der Höhe des Standards befand sich die Bande der jeweils gesuchten Lipoidfraktion aus dem Sperry-Extrakt. Diese wurde

mit einem Spatel abgekratzt und in ein Reagenzglas gefüllt. Zu den Cholesterinesterfraktionen wurden drei bis vier ml Diäthyläther, zum Lecithin die gleiche Menge Methanol hinzugefügt und gut durchgeschüttelt. Um das Lipoid/Äther-Gemisch bzw. das Lipoid/Methanol-Gemisch ganz vom Kieselgel zu trennen, wurde 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser Vorgang des Auswaschens wurde einmal wiederholt und anschließend das Kieselgel verworfen.

4. Umestern in Methylester

Zur Trennung der Fettsäuren im Gaschromatographen wurden die Methylderivate hergestellt. Auf diese Weise wurde verhindert, daß die Fettsäuren im dampfförmigen Zustand dimerisieren. Letzteres hätte eine unvollständige Trennung der Fettsäuren im Gaschromatographen zur Folge.

Um nach der Elution des Kieselgels das Lösungsmittel vollständig zu entfernen, wurde das Eluat im Rotationsverdampfer zur Trockne gebracht, in Reagenzgläser mit Schliff übergeführt und mit Stickstoff getrocknet.

Zur Umesterung des nun lösungsmittelfreien Lipoidrückstandes wurden 1,3 ml Essigsäuremethylester, 2,6 ml 5-prozentige methanolische HCL und zwei kleine Siedesteinchen gegeben. Daraufhin steckte man auf das Rea-

genzglas einen Rückflußkühler und kochte das Gemisch zwei Stunden in einem auf 70°C erhitzten Wasserbad. Die entstandenen Fettsäuremethylester ließ man auf Raumtemperatur abkühlen.

5. Ausäthern und Neutralisieren

Zur Weiterverarbeitung wurden die Fettsäuremethylester aus ihrer Lösung mit einem Gemisch aus Petroläther und Diäthyläther zu gleichen Teilen und Aqua bidest. extrahiert. Zur Probe gab man 2 ml Aqua bidest. und 1,5 ml des Äthergemisches, schüttelte kräftig und ließ das Reagenzglas drei Minuten stehen. Es trennten sich zwei Phasen. Die obere Äther-Phase mit den darin gelösten Fettsäuremethylestern wurde in ein neues Reagenzglas abpipettiert. Die untere wässrige Phase wurde noch zweimal mit je 1,5 ml des Petroläther/Diäthyläther-Gemisches nachgewaschen und die jeweils entstandene obere Phase in dasselbe Reagenzglas übergeführt.

Bei stärkeren Abweichungen des pH-Wertes vom Neutralpunkt werden die Fettsäuren instabil. So können sich durch alkoholische Hydrolyse Seifen abspalten. Um chemische Veränderungen durch das im sauren Milieu erfolgte Umestern zu verhindern, wurden die Methylester neutralisiert. Zu dem Äther/Lipid-Gemisch gab man 2 ml Aqua bidest. und drei bis fünf Tropfen Natriumbikarbo-

nat-Lösung. Nach kräftigem Schütteln trennten sich zwei Phasen voneinander. Die obere, das Äther/Lipid-Gemisch enthaltende Phase wurde abpipettiert und der ph-Wert der unteren wässrigen Phase mit Neutralisationsstäbchen (Fa. Merck, Darmstadt) kontrolliert. Er sollte sich zwischen 6,5 und 7,5 bewegen. Lag der ph-Wert außerhalb dieses Bereiches, wurden nochmals Natriumbicarbonat und Aqua bidest. zugegeben, bis sich der ph-Wert im gewünschten Bereich befand. Anschließend wurde das Lipidgemisch im Rotationsverdampfer zur Trockne ex vacuo eingengt und in 1 ml Petroläther aufgenommen.

6. Säulenchromatographie

Verunreinigungen und das freie Cholesterin wurden durch eine Säulenchromatographie entfernt.

Eine 40 cm lange Glassäule mit einem Innendurchmesser von 1,1 cm wurde an ihrem unteren Ende, das konisch zuläuft, mit einem Glasnagel und sechs bis acht 2 mm großen Glaskügelchen versehen und in eine Stativklemme eingespannt. Auf die Glasperlen brachte man Filterpapier, das eng an der Glaswand anlag und so ein Vorbeilaufen außerhalb des Papiers verhinderte. 4 g Kieselgel wurden in 15 ml Petroläther aufgeschwemmt und entlüftet, um beim Eingießen in die Säule Luftblasen zu vermeiden. Nach nochmaligem Nachspülen mit Petroläther

drückte man ein zweites Filterpapier auf die Kieselgelsäule, um ein Aufwirbeln zu unterbinden, und spülte nochmals nach. Das in 1 ml Petroläther gelöste Lipidgemisch wurde nun direkt auf das Filterpapier in der Säule aufgetragen. Zur Vermeidung von Lipidrückständen im Reagenzglas spülte man dieses dreimal mit je 1 ml Petroläther nach.

Es mußte besonders darauf geachtet werden, daß die Säule nicht trocken lief, da sonst eine einwandfreie Isolierung der Methylester ohne Substanzverlust nicht gewährleistet war.

Nun goß man einen Vorlauf von 15 bis 20 ml Petroläther in die Säule. Nach dem Durchlaufen wurde das Auffangglas durch einen Rundkolben von 100 ml Fassungsvermögen ersetzt.

In einem Schütteltrichter wurden 40 ml 5 %iger Diäthyläther in Petroläther angesetzt und über die Säule gegeben. Die so eluierten Fettsäuremethylester fing man im Rundkolben auf und engte sie im Rotationsverdampfer zur Trockne ein. Der Rückstand im Rundkolben wurde dreimal mit je 500 µl Chloroform (Uvasol) in ein Vial zur gaschromatischen Analyse übergeführt, mit Stickstoff eingeengt und luftdicht verschlossen.

7. Gaschromatographie

Die Gaschromatographie erfolgte auf einem Hewlett-Packard-Gerät, Modell 5830 A, ausgerüstet mit zwei Flammen-Ionisations-Detektoren und einem Modell 1885 A Gaschromatograph-Terminal. Zur Trennung der Fettsäure-Methylester wurde eine gepackte Säule (6 ft. und 2 mm i.D.) verwendet, gefüllt mit 10 % DEGS auf Chromosorb mesh 100 - 120. Mit einer Rate von 1°C/min wurde die Temperatur von 150 - 190°C programmiert. Die Identifikation der Fettsäuren erfolgte durch Vergleich mit Standard-Fettsäuren (Fa. Chrompack, Berlin).

C. ERGEBNISSE

I. Versuchspersonen

Nach einer anfänglichen Eingewöhnungszeit wurden die drei Formeldiäten von allen sechs Versuchspersonen verhältnismäßig gut vertragen. Die Probanden konnten während der Versuche ohne größere Schwierigkeiten ihrem Studium nachgehen und ihre täglich anfallenden Aufgaben bewältigen, so daß ein eindeutiger Leistungsabfall nicht festgestellt werden konnte. Jedoch wiesen alle sechs Teilnehmer am Ende der Versuchsperiode einen Gewichtsverlust auf, der zwischen 3,0 kg und 0,4 kg schwankte, wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist.

Die Umstellung auf Normalkost nach Beendigung der Diätperioden bereitete keine Schwierigkeiten.

II. Fettsäuren der Cholesterinester

Die prozentualen Veränderungen einzelner Fettsäuren in den Cholesterinestern wurden in der HDL- und LDL-Fraktion untersucht.

1. HDL (high density lipoproteins)

In der HDL-Fraktion ergaben sich folgende Verläufe
(Abb. 4):

Linolsäure (18 : 2, n - 6)

Bei einer relativ breiten Streuung der Werte, die Standardabweichung betrug nach Ablauf der FD I (mit 0 g Linolsäure) 5,6, zeigte sich bei allen Versuchspersonen eine signifikante Zunahme der Linolsäure in den Cholesterinestern nach Gabe der FD II mit 10 g Linolsäure und besonders nach der FD III mit 50 g Linolsäure. Die Einzelwerte nach FD I streuten zwischen 22,4 % und 38,7 %. Am Ende der zweiten FD erhielt man Werte von 33,7 % bis 46,5 % und am Ende der dritten Versuchsperiode stiegen die Einzelwerte auf 57,2 % bis 73,0 % an.

Die Mittelwerte waren entsprechend 32,2 %, 42,7 % und 63,6 % der Gesamtfettsäuren (Tabelle 10, Abb. 5).

Arachidonsäure (20 : 4, n - 6)

Der Gehalt an Arachidonsäure war über die gesamte Versuchsperiode niedrig. Er bewegte sich zwischen 5,0 % und 11,5 % nach linolsäurefreier Diät, zwischen 5,0 % und 10,9 % unter FD II und zwischen 5,3 % und 10,5 % unter dem Einfluß der FD III.

Die Mittelwerte betrugen 9,1 %, 7,8 % und 8,5 %.

Ölsäure (18 : 1)

Der Gehalt an Ölsäure verhielt sich zu dem an Linolsäure umgekehrt proportional. Unter linolsäurefreier FD I lagen die Anteile der Ölsäure an den Gesamtfettsäuren zwischen 26,2 % und 34,8 %, nach Ablauf der FD II zwischen 21,4 % und 28,4 % und am Ende der FD III zwischen 8,3 % und 13,9 %. Die Mittelwerte fielen von 29,4 % über 24,3 % auf 13,7 % ab.

Eikosatriensäure (20 : 3, n - 6)

Die Eikosatriensäure stellte den geringsten prozentualen Anteil an den Fettsäuren in der HDL-Fraktion der Cholesterinester während der Versuchsperiode. Die Anteile dieser Fettsäuren bewegten sich unter linolsäurefreier FD I von 0,6 % bis 2,1 %, nach FD II mit 10 g Linolsäure von 0,2 % bis 2,7 % und nach FD III mit 50 g Linolsäure von 0,2 % bis 1,0 %.

Die Mittelwerte sanken von 1,0 % bei linolsäurefreier Diät bis auf 0,5 % bei 50 g Linolsäurezufuhr ab.

Palmitinsäure (16 : 0)

Auch der Gehalt der Palmitinsäure ging bei zunehmender Linolsäurezufuhr in den drei verschiedenen Formeldiäten leicht zurück. Einzelwerte zwischen 8,9 % und 19,8 % wurden nach der zweiwöchigen FD I gemessen. Nach FD II schwankten sie zwischen 10,1 % und 18,7 % und nach der

dritten Diätperiode zwischen 4,0 % und 11,0 %.

Auch bei der 16 : 0 nahmen die Mittelwerte von 13,8 % über 12,5 % auf 8,7 % ab.

2. LDL (low density lipoproteins)

In den einzelnen Fettsäuren der LDL-Fraktion wurden folgende Veränderungen beobachtet (Abb. 6):

Linolsäure (18 : 2, n - 6)

Die Werte der Linolsäure, jeweils nach den zweiwöchigen Diätperioden gemessen, bewegten sich zwischen 31,3 % und 39,7 % nach FD I, zwischen 42,4 % und 51,3 % nach FD II und zwischen 47,8 % und 69,3 % nach FD III. Die Streuung der Meßwerte nach FD III war die höchste im gesamten Ernährungsversuch (siehe Tabelle 11). Die Standardabweichung betrug 7,7. Die Mittelwerte zeigten mit 34,7 %, 47,4 % und 58,0 % eine deutliche Zunahme des Linolsäuregehaltes mit der höheren Zufuhr (Abb. 7).

Arachidonsäure (20 : 4, n - 6)

Anders verhielt sich die Arachidonsäure. Bei den Versuchspersonen schwankten die Werte zwischen 4,9 % und 12,8 % nach linolsäurefreier FD I, zwischen 8,1 % und 12,4 % nach FD II mit 10 g Linolsäurezufuhr und zwi-

schen 3,8 % und 10,8 % am Ende der dritten Formeldiätperiode. Mit Ausnahme der Versuchsperson F, die bei linolsäurefreier Diät auf einen Gehalt an Arachidonsäure von nur 4,9 % kam, wurde bei den übrigen fünf Teilnehmern bei zunehmender Linolsäurezufuhr ein fallender Arachidonsäurespiegel gemessen.

Die Mittelwerte ergaben nach FD I, II und III 10,5 %, 9,5 % und 6,0 %.

Ölsäure (18 : 1)

Das Verhalten der Ölsäure läßt eine deutliche Korrelation zur Linolsäure erkennen. Je stärker der Gehalt an Linolsäure steigt, desto mehr fällt der Anteil der Ölsäure ab. Die Mittelwerte, sie betragen 34,0 %, 23,0 % und 14,7 % jeweils nach den drei Formeldiäten gemessen, zeigen dies deutlich. Im einzelnen bewegten sich die Ölsäurespiegel von 28,7 % bis 44,7 % nach der ersten, von 20,7 % bis 27,4 % nach der zweiten und von 11,9 % bis 19,4 % nach der dritten Versuchsperiode.

Eikosatriensäure (20 : 3, n - 6)

Der prozentuale Anteil der Eikosatriensäure in der LDL-Fraktion der Cholesterinester war in allen drei Diätperioden sehr niedrig. Nach FD I konnten nur von vier der sechs Versuchspersonen Werte gemessen werden. Die Spiegel der Versuchspersonen D und E lagen unter 0,1 %.

Nach FD II war der Gehalt an 20:3 von Versuchsteilnehmer E ebenfalls nicht meßbar klein und nach FD III der der Versuchspersonen C und D. Die Mittelwerte der gemessenen Spiegel betrugen 0,7 %, 0,8 % und 0,4 %.

Palmitinsäure (16 : 0)

Auch die Spiegel der Palmitinsäure fielen prozentual im Verhältnis zum Gesamtfettsäuregehalt nach Linolsäurezufuhr ab. Werte zwischen 11,3 % und 26,4 % nach linolsäurefreier Formeldiät, Werte zwischen 6,6 % und 17,3 % nach der zweiten Versuchsperiode und Werte zwischen 4,3 % und 12,0 % unter dem Einfluß der dritten Formeldiät wurden gemessen.

Die Mittelwerte verringerten sich von 15,6 % über 9,9 % auf 8,8 % nach Formeldiät I, II und III.

III. Fettsäuren des Lecithins

Die prozentualen Veränderungen der einzelnen Fettsäuren im Lecithin wurden ebenfalls in der HDL- und LDL-Fraktion untersucht.

1. HDL (high density lipoproteins)

In der HDL-Fraktion wurden folgende Beobachtungen gemacht (Abb. 8):

Linolsäure (18 : 2, n - 6)

Mit zunehmendem Linolsäuregehalt der Formeldiät stieg auch die Linolsäure im Lecithin bei allen Versuchspersonen deutlich an. Während der Mittelwert nach linolsäurefreier FD I 15,1 % betrug, wuchs er nach FD II mit 10 g Linolsäure auf 22,2 % und nach FD III mit 50 g Linolsäure auf 29 % an (Abb. 9). Die Einzelwerte bewegten sich unter FD I von 9,9 % bis 19,9 %, die unter FD II von 19,5 % bis 24,4 % und die unter FD III von 22,6 % bis 35,1 % (Tabelle 12).

Arachidonsäure (20 : 4, n - 6)

Die Spiegel der Arachidonsäure verhielten sich entgegengesetzt. Sie sanken bei zunehmender Gabe von Linolsäure ab. Nur Versuchsperson E bildete eine Ausnahme. Sie zeigte einen deutlichen Anstieg der 20 : 4 von 18,8 % nach FD II auf 22,5 % nach FD III.

Unter linolsäurefreier FD I wurden Werte zwischen 28,9 % und 20,6 % nach Ablauf der FD II Werte zwischen 26,8 % und 18,4 % und am Ende der dritten Versuchsperiode Werte zwischen 22,5 % und 16,9 % gemessen.

Die Mittelwerte ergaben 25 % nach FD I, 21,7 % nach FD II und 18,9 % nach FD III.

Ölsäure (18 : 1)

Die Fettsäureanteile der Ölsäure lagen in der HDL-Fraktion insgesamt etwas niedriger als die der Arachidonsäure und fielen mit der Erhöhung der Linolsäurezufuhr ebenfalls ab. Sie zeigten nach der ersten Versuchsperiode Werte von 13,2 % bis 19,0 %, unter dem Einfluß von FD II Werte von 13,9 % bis 16,8 % und am Ende der zweiwöchigen FD III Werte von 9,2 % bis 11,9 %.

Die Mittelwerte verringerten sich von 16,8 % über 15,1 % bis auf 10,3 %.

Eikosatriensäure (20 : 3, n - 6)

Den relativ niedrigsten Anteil von den fünf untersuchten Fettsäuren in der HDL-Fraktion des Lecithins wies die Eikosatriensäure auf. Jedoch lag sie mit Mittelwerten von 4,3 % nach linolsäurefreier Diät, 4,0 % nach FD II mit 10 g Linolsäure und 2,3 % nach der dritten Formeldiät mit 50 g Linolsäure deutlich über den Spiegeln der HDL- und der LDL-Fraktionen der Cholesterinester.

Diese erreichten nur Mittelwerte zwischen 1,0 % und 0,4 % in beiden Fraktionen (Tabelle 10, Tabelle 11).

Palmitinsäure (16 : 0)

Die Mittelwerte der Palmitinsäure betrugen unter FD I 19,2 %, unter FD II mit 10 g Linolsäure 20,1 % und un-

ter FD III mit 50 g Linolsäure 17,0 %.

Auffällig war der leichte Anstieg des Mittelwertes unter dem Einfluß von FD II. Hier wurde bei vier der sechs Versuchspersonen ein höherer Wert gemessen. Bei den Versuchsteilnehmern A und B nahmen die Konzentrationen gering ab. Auch nach der dritten Formeldiätperiode stiegen die Werte von zwei der drei Versuchspersonen wieder gering an, während die der übrigen deutlich abfielen. Somit kann in der HDL-Fraktion des Lecithins bei der Palmitinsäure keine Relation zur Linolsäurezufuhr gefunden werden. Die Werte im einzelnen bewegten sich unter FD I zwischen 16,8 % und 22,6 %, die unter FD II zwischen 16,6 % und 25,2 % und die unter FD III zwischen 14,4 % und 19,5 %.

2. LDL (low density lipoproteins)

In der LDL-Fraktion des Lecithins ergaben sich für die fünf untersuchten Fettsäuren folgende Ergebnisse (Abb. 10):

Linolsäure (18 : 2, n - 6)

Der prozentuale Anteil der Linolsäure im Verhältnis zu den Gesamtfettsäuren nahm bei linolsäurehaltiger Diät deutlich zu. Während nach der zweiwöchigen linolsäurefreien Formeldiätperiode Einzelwerte zwischen 10,9 %

und 17,5 % gemessen wurden, erhielt man nach FD II mit 10 g Linolsäure Werte zwischen 17,0 % und 24,4 %. Noch höher waren die Ergebnisse nach der dritten Formeldiät. Sie stiegen von 18,8 % bis auf 34,6 % an, wobei sich eine relativ hohe Standardabweichung von 4,7 errechnete (Tabelle 13). Auch die Mittelwerte zeigten mit 14,2 %, 19,6 % und 27,2 % eine Erhöhung der Linolsäureanteile im Lecithin (Tabelle 13, Abb. 11).

Arachidonsäure (20 : 4, n - 6)

Der Gehalt der Arachidonsäure an den Gesamtfettsäuren verhielt sich zu denen der Linolsäure entgegengesetzt und sank mit zunehmender Linolsäurezufuhr um etwa 3 % ab. Er bewegte sich nach der zweiwöchigen linolsäurefreien Diät noch zwischen 13,7 % und 17,0 %. Unter dem Einfluß der FD II fiel er auf 11,3 % bis 15,7 %. Nach der 14tägigen FD III wurden Werte zwischen 6,2 % und 14,7 % erreicht.

Insgesamt lag der prozentuale Gehalt der Arachidonsäure in der LDL deutlich niedriger als in der HDL des Lecithins. Dies zeigt sich auch an den Mittelwerten, die mit 15,3 %, 12,9 % und 11,8 % um knapp 10 % unter dem Niveau der HDL-Fraktion liegen (Abb. 9, Abb. 11 und Tabelle 12, Tabelle 13).

Ölsäure (18 : 1)

Deutlicher als bei der Arachidonsäure ist bei der Ölsäure die Korrelation zur Linolsäure sichtbar. Mit Zunahme der Linolsäurezufuhr sank der prozentuale Gehalt der Ölsäure. Am Ende der 14tägigen linolsäurefreien Diät (FD I) wurden 15,9 % bis 22,2 % gemessen; nach den beiden Wochen mit 10 g Linolsäure (FD II) erhielt man Anteile von 12,6 % bis 18,7 %. Unter der FD II mit 50 g Linolsäure wurden schließlich Werte von 8,6 % bis 11,9 % gemessen. Die Mittelwerte fielen von 19,2 % nach FD I über 14,9 % nach FD II auf 10,0 % nach FD III ab.

Eikosatriensäure (20 : 3, n - 6)

Wie schon in den vorher beschriebenen Untersuchungsergebnissen, so bildete auch hier in der LDL-Fraktion des Lecithins die Eikosatriensäure den kleinsten prozentualen Anteil an den Gesamtfettsäuren. Unter dem Einfluß der FD I (0 g Linolsäure) wurden Einzelwerte zwischen 5,3 % und 1,3 % gemessen. Nach Ablauf der zweiten Formeldiät (10 g Linolsäure) erhielt man 3,4 % und 1,4 % und am Ende der FD III (50 g Linolsäure) Meßergebnisse zwischen 2,7 % und 1,3 %. Die Mittelwerte sanken bei steigender Linolsäurezufuhr in der Diät von 2,8 % über 2,2 % auf 1,9 % ab.

Palmitinsäure (16 : 0)

Die Mittelwerte der Palmitinsäure-Anteile waren 26,8 % unter linolsäurefreier Formeldiät, 24,2 % unter FD II und 19,4 % unter FD III. Die Einzelwerte der 16 : 0 lagen nach der linolsäurefreien FD I zwischen 32,1 % und 24,1 %, nach der zweiten Formeldiät zwischen 27,8 % und 21,0 %. Unter dem Einfluß der FD III wurden Werte zwischen 24,7 % und 13,2 % gemessen.

D. DISKUSSION

=====

Der tägliche Mindestbedarf des Erwachsenen an Linolsäure wird von Lang (19) mit 4 bis 5 g pro Tag angegeben. Schlierf (25) und Zöllner (40) halten 6,5 bis 7 g, das entspricht 2,3 % der Energiezufuhr pro Tag, für erforderlich.

Um die Plasmakonzentrationen von Cholesterin, Phosphatiden und Triglyceriden wirksam zu senken, ist mindestens eine tägliche Linolsäurezufuhr von 10 Energieprozent nötig (37, 1). Mit der in unseren Breiten üblichen Kost werden täglich 23 bis 27 g Linolsäure aufgenommen (37) und der Bedarfsüberschuß im Fettgewebe gespeichert. Dies führt beim Erwachsenen zu einem Linolsäure-Depot von über 500 g (38, 37). Aus diesem Grund ist erklärlich, warum bei kurzzeitiger linolsäurefreier Ernährung beim Erwachsenen keine Krankheitserscheinungen auftreten.

Ein Linolsäuremangel kann jedoch schon lange bevor sich Krankheitssymptome entwickeln an biochemischen Veränderungen der Lipidzusammensetzung des Plasmas erkannt werden.

Wie unser Versuch zeigt, ändert sich in Abhängigkeit von der Linolsäurezufuhr das Fettsäurespektrum der Plasmalipide. Je höher die Linolsäurezufuhr, desto größer war die Anreicherung in allen vier untersuchten

Fraktionen des Lecithins und der Cholesterinester.

Dies ist in der Literatur seit langem bekannt und wurde auch in jüngeren Untersuchungen (20, 27, 32, 33, 34) immer wieder bestätigt.

In unserer Versuchsanordnung wurde die Linolsäurezufuhr von 0 % auf 20 % der Nahrungsenergie angehoben. Dies führte in dem Lecithin der LDL und HDL zu einem Anstieg der Linolsäureanteile um etwa 13 % (Tabellen 12 und 13), während in den Cholesterinestern dieser Lipoproteinfraktion eine Zunahme um 24 % (LDL) bzw. 31 % (HDL) beobachtet wurde (Tabellen 10 und 11). Dies entspricht den Berichten in der Literatur (38), die einen Linolsäureanteil von 50 % in den Cholesterinestern feststellen, während der Linolsäureanteil in den Phosphatiden mit 23 % der Gesamtfettsäuren nur halb so hoch ist.

Ein Linolsäureabfall in den Plasmalipiden unter linolsäurefreier Nahrung ist schon seit den Untersuchungen von Burr und Burr an Ratten bekannt (6). Wiese und Hansen (33), Collins (7) und Freund (10) konnten beim Menschen Symptome des Linolsäuremangels nachweisen, die bei Gabe linolsäurereicher Fette wieder verschwanden.

Ahrens (3), Fairhurst (9) und Zöllner (40) berichten über eine deutliche Abnahme der Linolsäure im Plasma nach einer Woche fettfreier Kost. Die an den darauffolgenden Versuchstagen gemessenen Werte zeigten eine wei-

tere Abnahme der Linolsäureanteile. Dabei konnte zwar ein relativer Anstieg der Ölsäure sowohl in den Phosphatiden als auch im Cholesterinester beobachtet werden, jedoch blieb der Gehalt an Arachidonsäure konstant (40). Zu demselben Ergebnis kamen Weiner und Sprecher (32). Weder in Thrombozyten noch in der Leber der Ratten stellten sie bemerkenswerte Änderungen der Arachidonsäure fest.

Winkler (34) konnte in seinen Versuchen an Feten und Plazenta der Ratte nachweisen, daß es bei fettfreier Ernährung weder in den Gewebslipiden der fetalen Organe noch in der Plazenta des Muttertiers zu einem Absinken der Arachidonsäure-Anteile kommt. Vielmehr war die Synthese der Arachidonsäure aus Linolsäure in der Plazenta unter fettfreier Ernährung sogar erhöht. Die Aufrechterhaltung der konstanten Bereitstellung von Arachidonsäure auch bei kurzfristigem Fehlen der Linolsäure in der Nahrung hat entscheidende Bedeutung für den tierischen und menschlichen Organismus. Denn damit ist die Bildung von Prostaglandinen und Prostacyclinen gewährleistet.

Eine Erklärung für die Abnahme der Arachidonsäureanteile trotz erhöhter Linolsäurezufuhr fanden Dunbar und Bailey (8). Sie belegten anhand ihrer Versuche mit verschiedenen Säugetierzellen in Gewebekulturen, daß heteroploide und transformierte Zellen nicht imstande

sind, aus Linolsäure Linolensäure zu bilden, jedoch Arachidonsäure aus Linolensäure.

Dies zeigt, daß zwei getrennte Enzymsysteme, die Delta-6- und die Delta-5-Desaturasen Linolsäure in Arachidonsäure überführen. Im Gegensatz zu diploiden Zellen ist nach Untersuchungen der Japaner Maeda, Doi und Akamatsu (20) in transformierten Säugetierzellen, sofern sie Linolsäure nicht benötigen, die Delta-6-Desaturase-Aktivität verlorengegangen. Thrombozyten, Gefäßendothelien und Nieren synthetisieren zwar Prostaglandine, sind jedoch nach Weiner (32) nicht imstande, Arachidonsäure aus Linolsäure zu bilden.

Spector et al. (27) fanden in menschlichen Endothelzellen eine Verringerung der Delta-6-Desaturase-Aktivität durch Linolsäureanreicherung. Dies bedeutet, daß Endothelzellen nur in beschränktem Maß Arachidonsäure aus Linolsäure bereitstellen können. Zudem vermindern hohe Konzentrationen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren wahrscheinlich durch kompetitive Hemmung den Einbau der Arachidonsäure in zelluläre Phospholipide. Dies wäre eine Erklärung für den relativ konstanten Arachidonsäurespiegel in den untersuchten Lipoproteinfraktionen der Cholesterinester und des Lecithins in unserem Versuch.

Im Gegensatz zur Arachidonsäure änderten sich die Anteile der Ölsäure während wechselnder Linolsäurezufuhr

in unseren Versuchen deutlich. Mit steigendem Linolsäuregehalt fiel der Ölsäureanteil ab. Da die Linolsäure in den Cholesterinestern relativ höhere Werte erreichte als im Lecithin, fiel auch in den Cholesterinestern die Ölsäure prozentual stärker als im Lecithin. Linolsäure und Ölsäure verhielten sich gegensinnig. Auf eine steigende Ölsäure als Indikator eines Linolsäuremangels wiesen Lang (19), Collins (7), Wolfram (37) und Adam (1) hin. Weiner (32) fand bei mit ölsäurehaltiger Diät gefütterten Ratten verminderte Linolsäure- und erhöhte Ölsäurespiegel. Die Summe des Gehaltes an Linolsäure und Ölsäure in Phospholipiden der Thrombozyten und der Leber war ziemlich konstant, unabhängig von den Fettsäureanteilen im Futter der Ratten. Daraus wurde auf einen spezifischen Ersatz der Linolsäure durch Ölsäure unter linolsäurefreier Kost geschlossen.

Die Eikosatriensäure verhielt sich, wie unsere Versuchsergebnisse zeigen, wie die Ölsäure. Aufgrund des geringen prozentualen Anteils der Eikosatriensäure in den untersuchten Fraktionen konnte sich bei Linolsäureanstieg nur ein geringer Abfall der Eikosatriensäure ausbilden. Wie die Mittelwerte zeigen, ist er in den LDL und HDL des Lecithins, bedingt durch die geringfügig höheren Spiegel etwas ausgeprägter. Bei linolsäurefreier Kost fanden wir, wie auch Lang (19),

Collins (7), Zöllner (40) und andere eine Vermehrung der Eikosatriensäure.

Auch die Palmitinsäure zeigt in allen vier untersuchten Lipiden ernährungsabhängige Veränderungen. Ein deutlicher Abfall ergab sich in der LDL-Fraktion des Lecithins, während in den drei übrigen Lipoiden keine ausgeprägten Änderungen nachzuweisen waren. Diese Feststellung machte auch Weiner (32). Er konnte keine diätabhängigen Veränderungen des Gehaltes an Palmitinsäure feststellen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

=====

Sechs gesunde weibliche Versuchspersonen erhielten über jeweils zwei Wochen Formeldiäten (FD), die eine Zufuhr an Linolsäure von 0 g/d (FD I), 10 g/d (FD II) oder 50 g/d (FD III) erlaubten. Am Ende jeder Versuchsperiode wurden die Fettsäuren in den Cholesterinestern und im Lecithin der HDL und LDL bestimmt.

Die Linolsäure reicherte sich mit steigender Zufuhr in allen vier untersuchten Lipiden an. Die Zunahme war beim Vergleich der FD I mit FD III in den Cholesterinestern der LDL (+ 23 %) und HDL (+ 31 %) durchschnittlich doppelt so hoch wie im Lecithin der LDL (+ 13 %) und HDL (+ 14 %). Die Ölsäure nahm unter diesen Versuchsbedingungen ab, in den Cholesterinestern der LDL und HDL im Mittel um 17 % und im Lecithin um 8 %.

Die Arachidonsäure nahm beim Vergleich der FD I mit FD III in den Cholesterinestern der LDL (- 4,5 %) und im Lecithin der HDL (- 6 %) ab, während im Lecithin der LDL (- 1,5 %) keine meßbare Änderung zu beobachten war.

Die Untersuchungen zeigen, daß Linolsäurezufuhr zu einer Anreicherung dieser essentiellen Fettsäure vor allem in den Cholesterinestern der LDL und HDL führt, aber keine vermehrte Bildung von Arachidonsäure in die-

sen Lipiden meßbar ist. Vielmehr zeigte sich eine Abnahme der Arachidonsäure im Lecithin der HDL, während die Arachidonsäureanteile im LDL-Lecithin durch die Linolsäurezufuhr nicht verändert wurden.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Adam, O.: Ernährung, Prostaglandine und Koronarinfarkt. Dtsch. Ärztebl. 13, Ausgabe B: 997 (1984)
- (2) Adam, O., Wolfram G., Zöllner, N.: Phosphatidfraktionen im Plasma des Menschen unter dem Einfluß von Formeldiäten mit modifizierten Fettanteilen. Infusionstherapie 6: 176 (1979)
- (3) Ahrens, E.H. jr., Spitz, N.: Further Studies of Fat and Lipemia by Feeding Fat. Biochemical Problems of Lipids. B.B.A. Library 1: 304 (1963)
- (4) Assmann, G.: Lipidstoffwechsel und Atherosklerose. 1, Stuttgart (1982)
- (5) Böhle, E.: Nahrungsfette und Stoffwechsel. Münch. med. Wschr. 106: 1165 (1964)
- (6) Burr, G.O. und Burr, M.M.: New Deficiency Disease Produced by Rigid Exclusion of Fat from Diet. J. biol. Chem. 82: 345 (1929)
- (7) Collins, F.D., Sinclair, A.J., Royle, J.P., Coats, D.A., Maynard, A.T., Leonard, R.F.: Plasma Lipids in Human Linoleic Acid Deficiency. Nutr. Metab. 13: 150 (1971)
- (8) Dunbar, L.M., Bailey, J.M.: Enzyme Deletions and Essential Fatty Acid Metabolism in Cultured Cells. J. biol. Chem. 250: 1152 (1975)

- (9) Fairhurst, B.J., Waterhouse, C.: The Effect of Previous Dietary Intake on the Fatty Acid Composition of the Plasma Cholesterol Esters. *Am. J. clin. Nutr.* 13: 92 (1963)
- (10) Freund, H., Flohmann, N., Schwartz, B., Fischer, J.E.: Essential Fatty Acid Deficiency in Total Parenteral Nutrition. *Ann. Surg.* 190: 239 (1979)
- (11) Glomset, J.A.: The Plasma Lecithin: Cholesterol Acyltransferase. *J. Lipid. Res.* 9: 155 (1968)
- (12) Goto, Y.: Workshop: Dietary Management of Hyperlipoproteinemias. In: Schettler, G., Weizel, A. (Hrsg.): *Atherosclerosis 3*: 761, Berlin, Heidelberg, New York (1974)
- (13) Heyden, S.: Atherosklerotische Herzerkrankungen und Ernährung. In: Holtmeier, H.-J. (Hrsg.): *Ernährungslehre und Diätetik II/2*: 1, Stuttgart (1972)
- (14) Katan, M.B., Beynen, A.C.: Linoleic Acid Consumption and Coronary Heart-Disease in U.S.A. and U.K. *Lancet* 15: 371 (1981)
- (15) Keys, A.: Coronary Heart Disease in Seven Countries. *Circulation* 61 und 62, Suppl. 1: 1 (1970)
- (16) Klenk, E., Hoppe-Seylers: Über die Biogenese der C₂₀- und C₂₂-Polyenfettsäuren in der Säugetierleber. *Z. Physiol. Chem.* 302: 268 (1955)
- (17) Kostner, G.M.: HDL-Cholesterin als Schutzfaktor gegen koronare Herzkrankheit. *Internistische Welt* 8: 19/311 (1981)

- (18) Kupke, J.R.: Die Arteriosklerose als pädiatrisches Problem. Frühstadien der Atherogenese. Dtsch. Arztebl. 39, Ausgabe B: 2793 (1984)
- (19) Lang, K., Fekl, W., Berg, G.: Balanced Nutrition and Therapy. 22, Stuttgart (1971)
- (20) Maeda, M., Doi, O., Akamatsu, Y.: Metabolic Conversion of Polyunsaturated Acids in Mammalian Cultured Cells. Biochim. biophys. Acta 530: 153 (1978)
- (21) Mathias, M.M. und Mitarbeiter: Dietary Linoleate Effect upon Prostaglandin and Thromboxane Synthesis. Prostaglandines 15: 706 (1978)
- (22) Olson, R.E., Vester, J.W.: Nutrition - Endocrine Interrelationships in the Control of Fat Transport in Man. Physiol. Rev. 40: 672 (1960)
- (23) Scherer, R.: Lecithinabbau und Cholesterinveresterung im Humanserum. Klin. Wschr. 52: 203 (1974)
- (24) Schlierf, G., Wolfram, G.: Bedeutung des Fettes als krankmachender Faktor in der Ernährung. Internist 18: 480 (1977)
- (25) Schlierf, G., Wolfram, G.: Ernährungstherapie in der Praxis. 12, München (1975)
- (26) Simon, J.B., Boyer, J.L.: Production of Lecithin: Cholesterol Acyltransferase by the Isolated Perfused Rat Liver. Biochim. biophys. Acta 218: 549 (1971)

- (27) Spector, A.A., Kaduce, T.L., Hoak, J.C., Fry, G.L.: Utilization of Arachidonic and Linoleic Acids by Cultured Human Endothelial Cells. J. clin. Invest. 68: 1002 (1981)
- (28) Sperry, W.M.: Lipid Analysis. In: Methods of Biochemical Analysis 2: 83 Interscience Publishers New York, London (1955)
- (29) Statistisches Jahrbuch, Fachserie 12 (Gesundheitswesen), Reihe 4 (Todesursachen). Hrsg.: Statistisches Bundesamt Wiesbaden: 88 (1982)
- (30) Stoffel, W., Därr, W., Assmann, G.: Pleomorphe Funktionen von hochungesättigten Phospholipiden in biologischen Membranen und Serumlipoproteinen. Med. Welt 29: 124 (1978)
- (31) Teuteberg, H.J., Wiegelmann, G.: Der Wandel der Nahrungsgewohnheiten unter dem Einfluß der Industrialisierung. 188, Göttingen (1972) (Studien zum Wandel von Gesellschaft und Bildung im 19. Jahrhundert. 3)
- (32) Weiner, T.W., Sprecher, H.: Arachidonic Acid, 5, 8, 11-Eicosatrienoic Acid and 5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic Acid. Biochim. biophys. Acta 792: 293 (1984)
- (33) Wiese, H.F., Hansen, A.E., Adam, D.J.D.: Essential Fatty Acids in Infant Nutrition. J. Nutr. 66: 345 (1958)

- (34) Winkler, L., Schlag, B., Franke, S., Kessner, Ch., Maess, J., Pautzke, M., Goetze, E.: Der Einfluß fettfreier Diät während der letzten Schwangerschaftswoche auf den Linol- und Arachidonsäuregehalt der Organlipide des Feten und der Plazenta der Ratte. Acta biol. med. germ. 611 (1979)
- (35) Wirths, W.: Nahrungsversorgung der Bevölkerung. In: Holtmeier, H.-J. (Hrsg.), Med. Ernähr. 3: 164, Stuttgart 1977
- (36) Wolfram, G.: Ernährung, Serumlipide und Arteriosklerose. Med. Ernähr. 12: 206 (1971)
- (37) Wolfram, G., Adam, O.: Klinische Bedeutung essentieller Fettsäuren. Münch. med. Wschr. 122: 203 (1974)
- (38) Wolfram, G., Zöllner, N.: Der Linolsäurebedarf des Menschen. Wissenschaftliche Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung. 22, Polyenfettsäuren: 51, Darmstadt (1971)
- (39) Zöllner, N., Eberhagen, D.: Untersuchungen und Bestimmungen der Lipoide im Blut. 56, Frankfurt (1965)
- (40) Zöllner, N., Wolfram, G., Longdong, W.: Untersuchungen über die Plasmalipide bei extrem fettarmer kohlenhydratreicher Kost. Z. ges. exp. Med. 140: 24 (1966)

ANHANG: TABELLEN UND ABBILDUNGEN
=====

Tabelle 1: Infarktmortalität und Fettverzehr in
 Japan nach Goto, 1974 (12)

Jahr	Infarktmortalität (pro 100.000)	Fettverzehr (g/Tag)
1955	9,9	18
1965	28,5	36
1970	37,9	46,5

Tabelle 2: Daten der Versuchspersonen

Versuchsperson	Geschlecht	Größe (cm)	Alter (a)	Gewicht vor Versuch (kg)	Gewicht nach Versuch (kg)
A	weiblich	152	27	47,5	44,5
B	weiblich	160	26	51,0	49,7
C	weiblich	161	27	54,3	53,9
D	weiblich	176	27	68,1	67,5
E	weiblich	159	29	52,9	52,0
F	weiblich	157	26	50,9	48,7

Tabelle 3: Zuteilung der Versuchspersonen A bis F zu den Formeldiäten I, II und III, von denen jede zwei Wochen lang gegeben wurde

Versuchs- person	Woche 1 und 2	Woche 3 und 4	Woche 5 und 6
A und B	III	I	II
C und D	I	II	III
E und F	II	III	I

Tabelle 4: Zusammensetzung der Formeldiäten I, II und III in Energieprozent der Nahrung

Formeldiät	Eiweiß	Kohlenhydrat	Fett
	Energie %		
I	15	85	-
II	15	55	30 (davon 4 % Linolsäure)
III	15	55	40 (davon 20 % Linolsäure)

Tabelle 5: Zusammensetzung des Fettanteils, berechnet für 2200 kcal

Formeldiät	Zusammensetzung des Fettanteils	P/S-Quotient
I	-	-
II	Distelöl 9,7 g Olivenöl 17,7 g Butter 47,0 g	0,47 (mit 10 g Linolsäure)
III	Distelöl	11,14 (mit 50 g Linolsäure)

Tabelle 6: Prozentualer Anteil an gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren in dem verwendeten Fett der Formeldiät II

Sättigungsgrad	Distelöl	Olivenöl	Butter	Fettgemisch
gesättigt	7 %	10 %	58 %	36 %
einfach ungesättigt	15 %	82 %	37 %	47 %
mehrfach ungesättigt	78 %	9 %	4 %	17 %

Tabelle 7: Aufschlüsselung der Formeldiät I, berechnet für 2200 kcal

Nährstoffquelle (g/d)	Nährstoff (g/d)	Energiezufuhr (kcal/d)	Energiezufuhr / Tag (Joule/d)	Energieprozent
Hyperprotidine 87,0	Protein 80,0	330	1381,4	15
Maltodextrin 483,0	Kohlenhydrat 456,0	1870	7827,8	85
Summe		2200	9209,2	100

Tabelle 8: Aufschlüsselung der Formeldiät II, berechnet für 2200 kcal

Nährstoffquelle (g/d)	Nährstoff (g/d)	Energiezufuhr / Tag (kcal/d)	Energiezufuhr / Tag (Joule/d)	Energieprozent
Hyperprotidine 87,0	Protein 80,0	330	1381,4	15
Maltodextrin 312,0	Kohlenhydrat 295,0	1210	5065,1	55
Distelöl Olivenöl Butter	Fett 71,0	660	2762,8	30
darin 10,0 Linolsäure	Fettsäure (10,5)	(94)	(393,5)	(4,3)
Summe		2200	9209,2	100

Tabelle 9: Aufschlüsselung der Formeldiät III, berechnet für 2200 kcal

Nährstoffquelle (g/d)	Nährstoff (g/d)	Energiezufuhr (kcal/d)	Energiezufuhr / Tag (Joule/d)	Energieprozent
Hyperprotidine 87,0	Protein 80,0	330	1381,4	15
Maltodextrin 312,0	Kohlenhydrat 295,0	1210	5065,1	55
Distelöl 71,0	Fett 71,0	660	2762,8	30
darin 50,0 Linolsäure	Fettsäure (42,7)	(388,6)	(1626,7)	(17,4)
Summe		2200	9209,2	100

Tabelle 10:

Anteile einzelner Fettsäuren (Prozent der Gesamtfettsäuren) in den Cholesterinestern der HDL-Fraktion der Versuchspersonen A bis F am Ende der zweiwöchigen Formeldiätperioden I, II und III

Versuchs- person	18 : 2			20 : 4			18 : 1			20 : 3			16 : 0		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
A	33,7	42,5	65,1	10,0	9,4	5,3	27,7	21,4	13,9	2,1	2,7	0,4	16,6	10,1	9,9
B	27,8	42,5	61,4	10,9	8,8	10,5	27,8	21,7	12,8	1,9	0,8	0,2	13,3	11,0	9,7
C	33,8	45,0	73,0	6,0	10,9	8,5	33,0	24,4	8,3	0,4	0,6	0,5	14,0	10,7	4,0
D	22,4	33,7	65,3	5,0	8,4	7,1	34,8	22,8	11,0	0,3	1,3	1,0	19,8	18,7	9,0
E	36,9	46,5	57,2	11,5	5,0	6,1	26,2	27,0	12,8	0,7	0,2	0,4	10,4	12,0	11,0
F	38,7	46,2	59,4	11,0	4,3	7,8	27,0	28,4	12,8	0,6	0,2	0,2	8,9	12,3	8,8
Mittelwerte															
	32,2	42,7	63,6	9,1	7,8	8,5	29,4	24,3	13,7	1,0	1	0,5	13,8	12,5	8,7
Standardabweichung															
	5,6	4,3	5,1	2,6	2,4	1,7	3,3	2,6	1,8	0,7	0,0	0,3	3,6	2,9	2,2

Tabelle 11: Anteile einzelner Fettsäuren (Prozent der Gesamtfettsäuren) in den Cholesterinestern der LDL-Fraktion der Versuchspersonen A bis F am Ende der zweiwöchigen Formeldiätperioden I, II und III

Versuchs- person	18 : 2			20 : 4			18 : 1			20 : 3			16 : 0		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
A	36,2	46,0	56,9	12,8	8,5	4,9	33,2	21,2	14,8	0,2	0,6	0,1	16,7	12,1	10,4
B	31,3	50,5	63,2	12,7	12,4	10,8	28,9	20,7	13,4	1,7	0,7	0,2	12,8	6,7	8,2
C	34,6	48,0	52,0	12,8	11,3	6,4	32,1	21,5	19,4	0,4	0,6	-	11,3	6,6	8,4
D	34,0	51,3	69,3	8,8	5,4	3,8	35,0	21,6	12,9	-	1,4	-	13,5	7,2	9,3
E	32,5	42,4	47,8	10,9	8,1	3,9	44,7	27,4	11,9	-	-	0,4	26,4	17,3	4,3
F	39,7	46,3	58,8	4,9	11,1	6,3	30,1	25,3	15,5	0,3	0,5	0,9	12,8	9,7	12,0
Mittelwerte															
	34,7	47,4	58,0	10,5	9,5	6,0	34,0	23	14,7	0,7	0,8	0,4	15,6	9,9	8,8
Standardabweichung															
	2,7	3	7,0	2,9	2,4	2,4	5,2	2,5	2,4	0,6	0,3	0,3	5,1	3,8	2,4

Tabelle 12:

Anteile einzelner Fettsäuren (Prozent der Gesamtfettsäuren) im Lecithin der HDL-Fraktion der Versuchspersonen A bis F am Ende der zweiwöchigen Formeldiätperioden I, II und III

Versuchsperson	18 : 2			20 : 4			18 : 1			20 : 3			16 : 0		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
A	17,8	23,1	23,5	26,4	22,6	16,9	15,1	13,9	9,2	3,6	4,0	1,6	19,7	20,2	19,5
B	12,4	19,5	22,6	28,5	26,8	19,3	19,0	14,3	11,9	4,8	5,4	1,4	16,8	16,6	17,4
C	12,3	24,4	35,1	28,9	24,1	18,8	16,7	15,0	9,5	2,6	3,7	2,2	17,5	15,6	15,8
D	9,9	19,8	28,0	22,0	18,4	18,5	13,2	14,6	9,4	7,3	4,7	3,9	22,6	25,2	16,8
E	18,4	23,5	31,5	23,4	18,8	22,5	18,9	16,8	11,1	4,2	3,0	2,2	17,8	20,7	14,4
F	19,9	22,6	33,2	20,6	19,6	17,5	18,1	15,9	10,6	3,0	3,3	2,3	21,0	22,0	18,1
Mittelwerte															
	15,1	22,2	29	25	21,7	18,9	16,8	15,1	10,3	4,3	4,0	2,3	19,2	20,1	17,0
Standardabweichung															
	3,7	1,9	4,8	3,2	3,1	1,8	2,1	1	1,0	1,5	0,8	0,8	2,1	3,2	1,6

Tabelle 13:

Anteile einzelner Fettsäuren (Prozent der Gesamtfettsäuren) im Lecithin der LDL-Fraktion der Versuchspersonen A bis F am Ende der zweiwöchigen Formel-
diätperioden I, II und III

Versuchs- person	18 : 2			20 : 4			18 : 1			20 : 3			16 : 0		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
A	10,9	19,8	25,5	13,7	12,6	15,0	22,2	12,9	10,5	2,7	1,4	1,6	24,5	22,5	23,0
B	13,7	19,4	28,8	14,0	14,0	14,2	19,0	15,1	10,5	1,3	1,7	1,3	29,9	25,6	24,7
C	15,0	17,0	18,8	17,0	11,3	6,2	21,0	12,6	11,9	2,1	1,7	1,8	26,0	24,5	19,6
D	13,6	18,1	28,1	16,0	12,2	11,5	20,0	18,7	8,6	5,3	2,7	2,7	24,3	23,5	17,1
E	14,2	24,4	27,3	16,6	11,3	9,1	16,9	16,0	10,8	2,6	2,3	2,2	32,1	27,8	18,9
F	17,5	18,7	34,6	14,2	15,7	14,7	15,9	14,1	8,9	2,6	3,4	1,6	24,1	21,0	13,2
Mittelwerte															
	14,2	19,6	27,2	15,3	12,9	11,8	19,2	14,9	10,0	2,8	2,2	1,9	26,8	24,2	19,4
Standardabweichung															
2	2,3	4,7	1,3	1,6	3,2	2,2	2,1	1,1	1,2	0,7	0,5	3,1	2,2	3,8	3,8

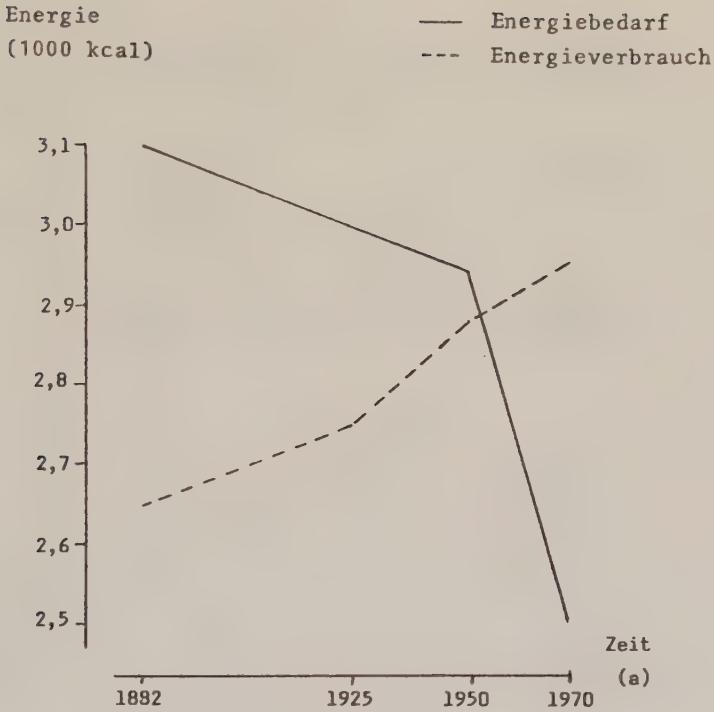


Abb. 1: Energiebedarf und Energieverbrauch der deutschen Bevölkerung in der zeitlichen Entwicklung in kcal pro Kopf und Tag nach Wirths, 1974 (31)

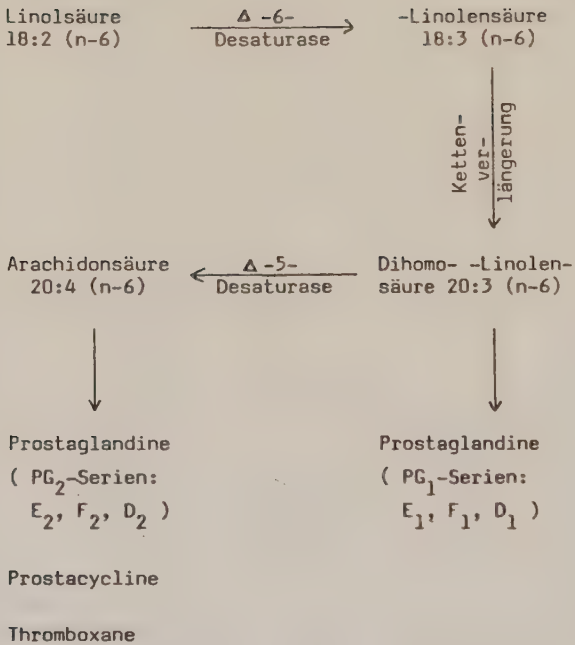


Abb. 2: Die Linolsäure und ihre Derivate nach Dunbar
1975 (8) und Adam, 1984 (1)

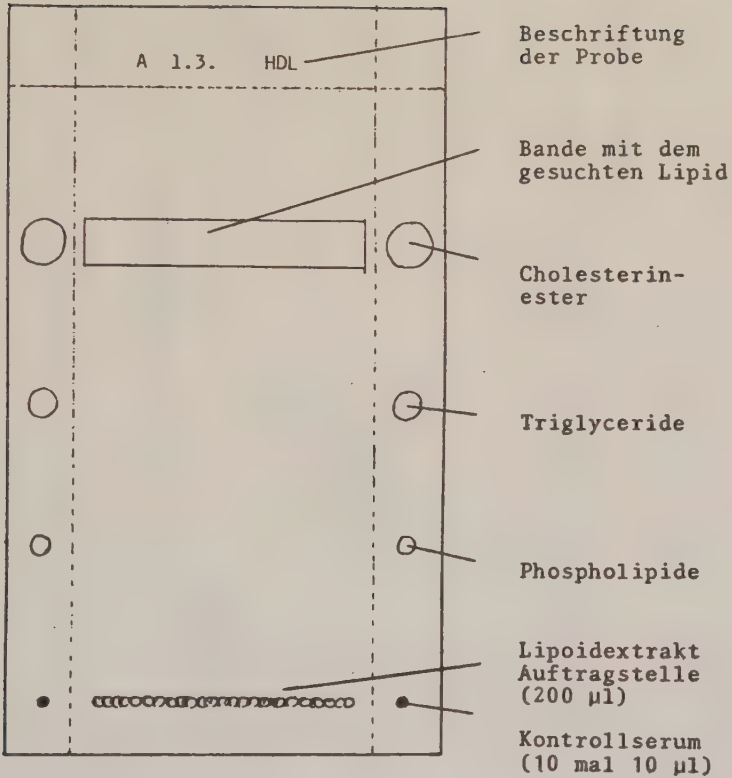


Abb. 3: Einteilung der Dünnschichtchromatographieplatte

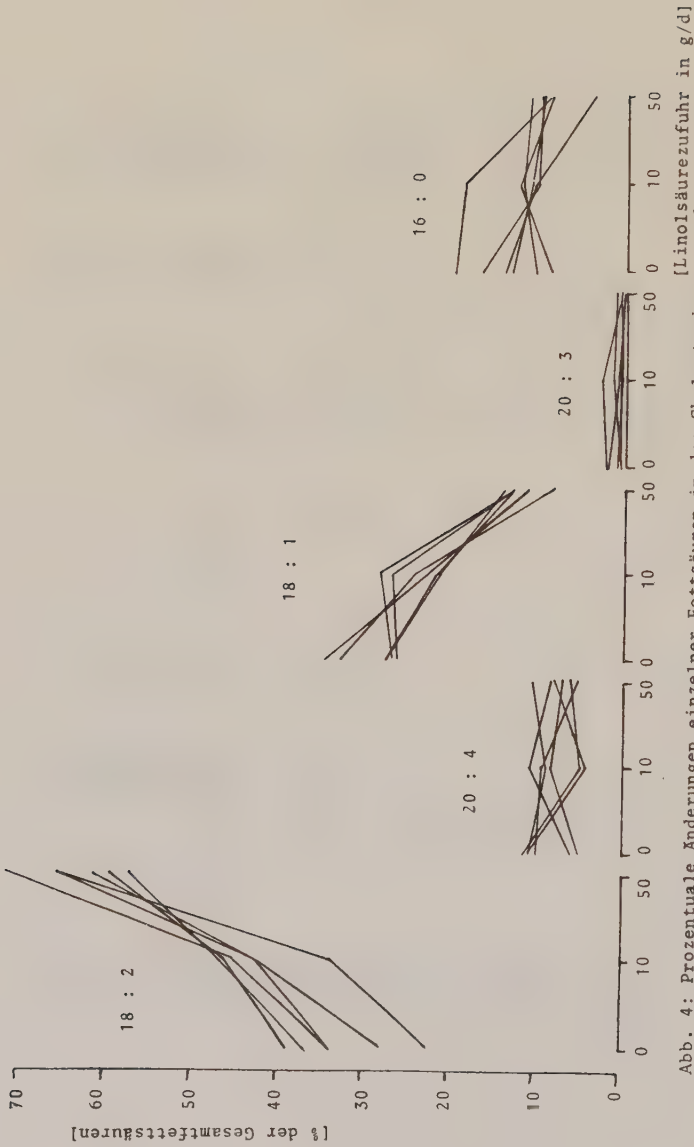


Abb. 4: Prozentuale Änderungen einzelner Fettsäuren in den Cholesterinestern der HDL der Versuchspersonen A bis F am Ende der zweiwöchigen Versuchsperioden mit einer Linolsäurezufuhr von 0 g, 10 g und 50 g/d.

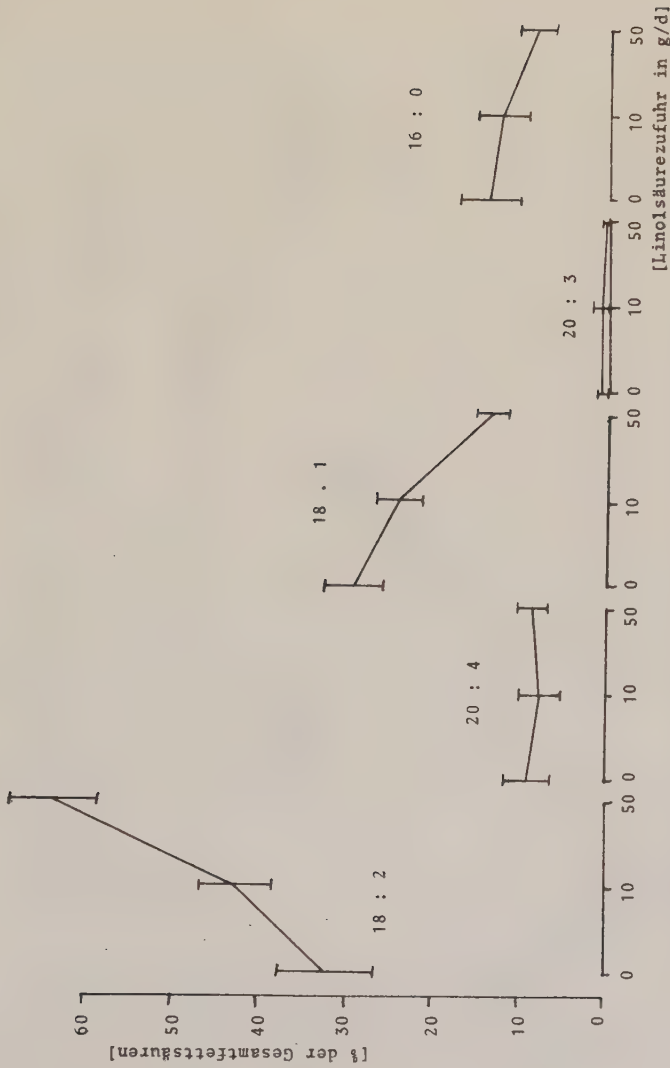


Abb. 5: Fettsäuren ($\bar{x} \pm SD$) der HDL-Cholesterinester der Versuchspersonen A bis F
am Ende der zweiwöchigen Versuchsperioden mit einer Linolensäurezufuhr von
0 g, 10 g und 50 g/d.

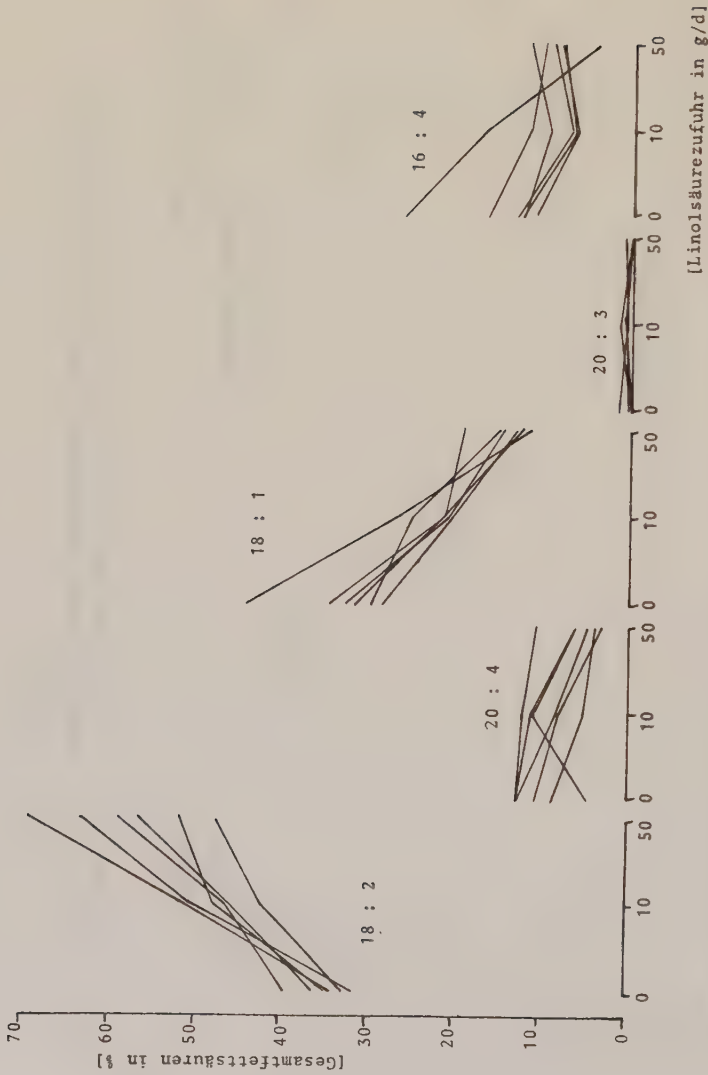


Abb. 6: Prozentuale Änderung einzelner Fettsäuren in den Cholesterinestern der LDL der Versuchspersonen A bis F am Ende der zweiwöchigen Versuchsperioden mit einer Linolsäurezufuhr von 0 g, 10 g und 50 g/d.

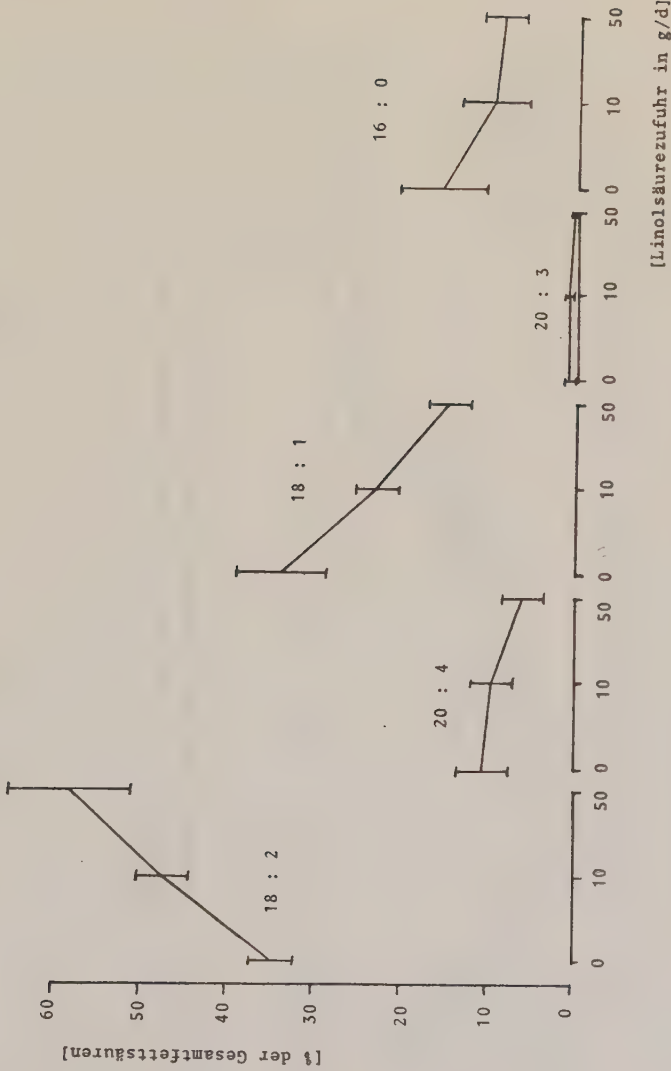


Abb. 7: Fettsäuren ($\bar{x} \pm SD$) der LDL-Cholesterinester der Versuchspersonen A bis F am Ende der zweiwöchigen Versuchsperioden mit einer Linolsäurezufuhr von 0 g, 10 g und 50 g/d.

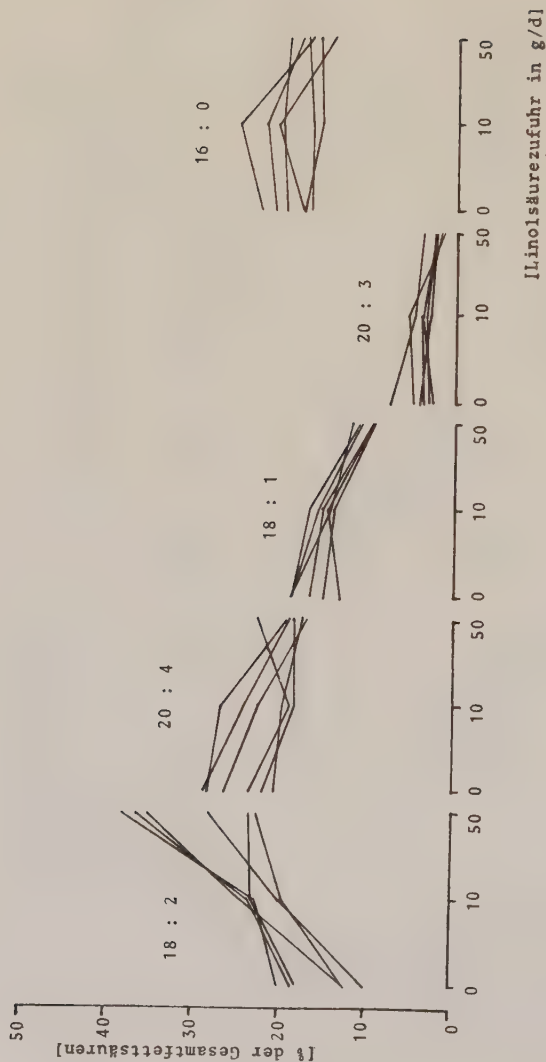


Abb. 8: Prozentuale Änderungen einzelner Fettsäuren im Lecithin der HDL der Versuchspersonen A bis F am Ende der zweiwöchigen Versuchsperioden mit einer Linolensäurezufuhr von 0 g, 10 g und 50 g/d.

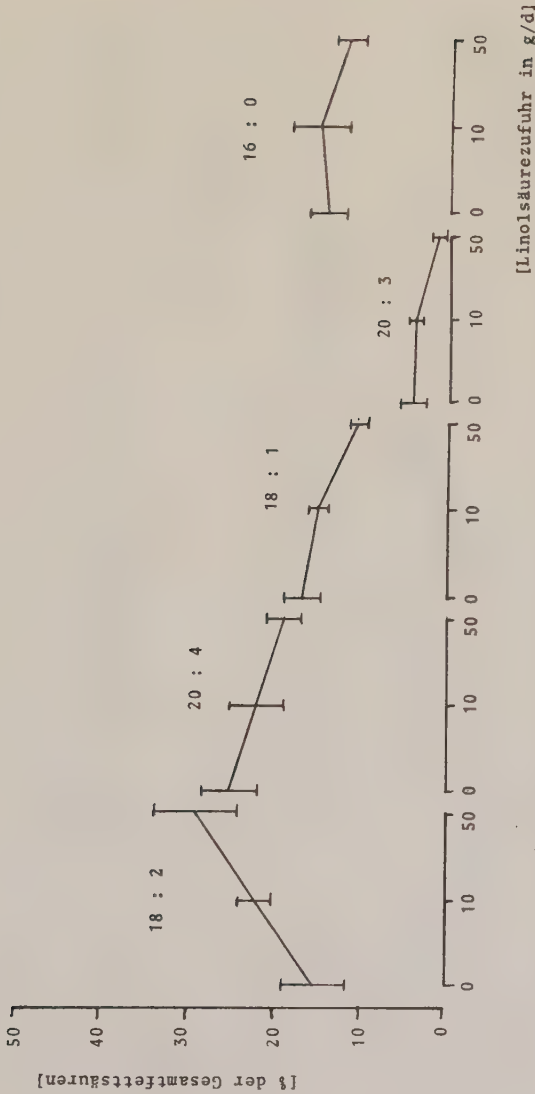


Abb. 9: Fettsäuren ($\bar{x} \pm SD$) des HDL-Lecithins der Versuchspersonen A bis F am Ende der zweiwöchigen Versuchsperioden mit einer Linolsäurezufuhr von 0 g, 10 g und 50 g/d.

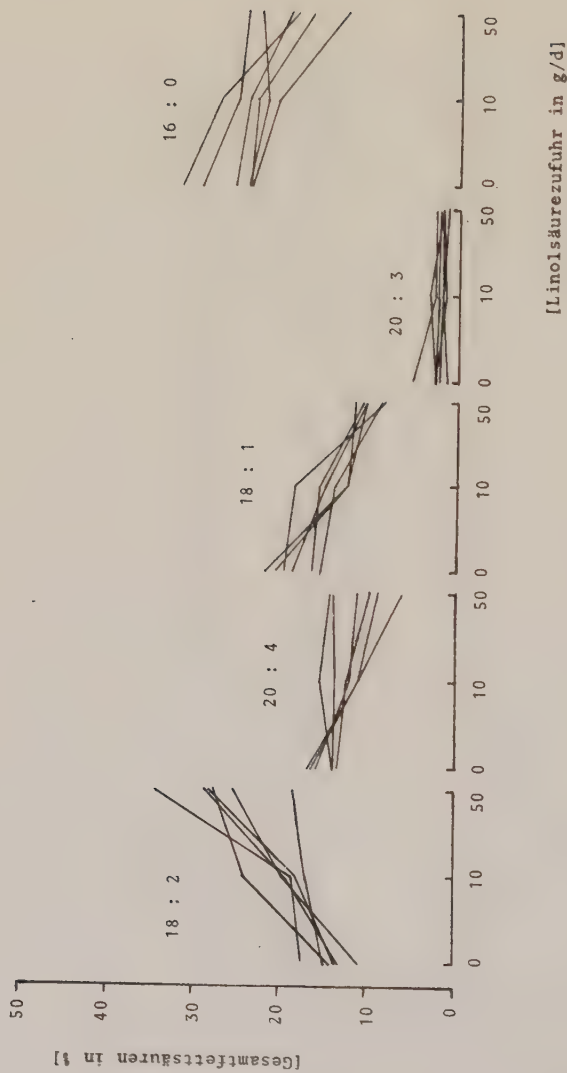
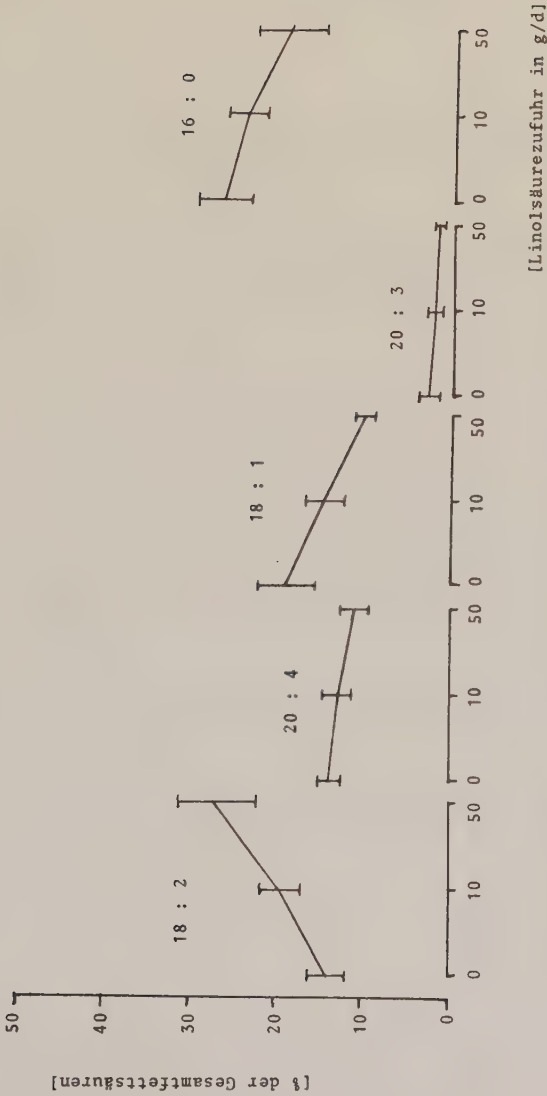


Abb. 10: Prozentuale Änderungen einzelner Fettsäuren im Lecithin der LDL der Versuchspersonen A bis F am Ende der zweiwöchigen Versuchsperioden mit einer Linolsäurezufuhr von 0 g, 10 g und 50 g/d.



LEBENS LAUF

Am 18.10.1950 wurde ich als erstes Kind meiner Eltern Marie und Hans Joachim Hennig in Nördlingen geboren.

Aus beruflichen Gründen - mein Vater war Offizier - zog die Familie 1958 nach Erding und 1966 nach Fürstenfeldbruck. Am dortigen Gymnasium erhielt ich nach 13 Zeit-Schuljahren im Mai 1970 das Reifezeugnis.

Anschließend studierte ich in München und Innsbruck Geographie und Germanistik und legte im Herbst 1975 das Examen ab. Von 1975 bis 1981 schrieb ich mich im Fach Humanmedizin ein und erhielt nach 12 Semestern am 19. Nov. 1981 die Approbation als Arzt. Ab Dez. 1981 war ich für ein Jahr im Klinikum Großhadern der Universität München als Assistenzarzt in der Chirurgie beschäftigt.

Am 8. Juli 1982 heiratete ich den Diplom-Volkswirt und Geschäftsführer Bernd Ertl.

1983 begann ich mit der Fortbildung für die Zusatzbezeichnung Naturheilverfahren, die ich im April 1985 erwarb.

Zur Zeit bin ich in einer Allgemeinpraxis in München tätig.

